Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Enzymological analysis of mutant protein kinase Cγ causing spinocerebellar ataxia type 14 and dysfunction in Ca2+ homeostasis

足立, 直子

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2008-09-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲4390
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004390

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏　　名	足立　直子
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1953 号
学位授与の 要　件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日　付	平成 20 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Enzymological analysis of mutant protein kinase Cγ causing spinocerebellar ataxia type 14 and dysfunction in Ca2+ homeostasis(脊髄小脳変性症１４型を引き起こす変異型 PKCγの酵素学的機能解析と Ca2+ホメオスタシス異常)

審 査 委 員

主 査　教　授　饗場　篤

教　授　寺島　俊雄

教　授　苅田　典生

脊髄小脳変性症、は小脳や脳幹、脊髄にかけての神経が細胞死を起こすことで運動機能を喪失する難病であり、主な症状として、脊髄・小脳の萎縮に起因する歩行失調、姿勢反射失調、眼振によるめまいなどがある。現在、有効な治療法は無く、発症メカニズムの解明、根本的治療方法の開発が急がれている。近年、第 19 染色体に連鎖する常染色体優性遺伝型の脊髄小脳変性症（SCA）として SCA14 が同定され、プロテインキナーゼ C（PKCγ）の 1 アミノ酸変異が、原因遺伝子であることが同定された。この報告以降、PKCγ 遺伝子上で続々と新たな 1 アミノ酸変異が報告され、これまでに 22 種の変異が異なる家系より見つかっている。興味深いことにこのうち 18 種が PKCγ の機能調節に重要な C1 ドメイン（C1A、C1B）に集中しており、また、それ以外の変異も種を越えて高度に保存された領域に位置していた。しかしながら、これらの変異がどのように神経変性に関与しているのかは全く解っていない。

そこで本研究では、SCA 患者より発見された PKCγ の 1 アミノ酸変異が PKCγ の機能をどのように変化させ、SCA 発症に至るのかを解明することを目的とし、培養細胞における分子レベルでの局在や動態、酵素学的な特性について解析した。

PKCγは機能調節領域にジアシルグリセロール（DAG）と結合する C1 ドメイン、Ca^{2+}と結合する C2 ドメインを有しており、細胞外からの刺激により上昇した、細胞内の Ca^{2+}に応答し、細胞質から細胞質膜へと移行（トランスロケーション）する。さらに、細胞質膜上で産生された DAG と結合することで活性化し、細胞質膜上において基質のリン酸化を行う。その後、細胞内の Ca^{2+}濃度の減少と共に細胞質へと戻り（リトランスロケーション）、不活性化状態となる。SCA14 変異型 PKCγでは多くの変異が C1 ドメインに集中していることから、これらの変異体では刺激に応じた細胞質膜へのトランスロケーションに変化が見られると予測した。そこで、SCA14 変異型 PKCγを蛍光タンパク質により標識し、細胞刺激時のトランスロケーションを観察、野生型との比較を行った。結果、変異型PKCγは、刺激後長時間にわたって、細胞質膜上に留まり続けた。そこで、EGTA を加え細胞外液中の Ca^{2+}をキレートしたところ、変異型 PKCγは速やかにリトランスロケーションした。つまり、変異型PKCγ発現細胞では細胞外からの Ca^{2+}流入により、長時間にわたって PKCγの細胞質膜トランスロケーションを引き起こしている可能性が考えられた。次に野生型、変異型 PKCγ発現細胞における、細胞内 Ca^{2+}の変化を観察した。結果、野生型PKCγ発現細胞では、刺激後、一過性に上昇した細胞内Ca^{2+} は速やかに減少した。一方、SCA14 変異体発現細胞では、細胞内 Ca^{2+}の半減期が野生型と比較して長くなっていることが解った。さらに、この Ca^{2+} の流入は 2-APB、SKF-96395 といった、細胞質膜貫通型 Ca^{2+}チャネルの一種である TRPC チャネルの阻害薬により抑制されることから、これらの Ca^{2+}流入には TRPC チャネルを介していることが考えられた。そこで、TRPC チャネルの内、小脳に多く発現している TRPC3 に注目し、PKCγによりリン酸化されるかどうか検討を行った。結果、*In vitro* において PKCγは TRPC3 チャネルをリン酸化し、TRPC3 は PKCγの基質となりえる可能性が示唆された。さらに、細胞内において、野生型では刺激依存的に TRPC3 のリン酸化が検出されたが、SCA14 変異体では有意なリン酸化は確認出来なかった。つまり、野生型PKCγは刺激に応じて細胞質膜へとトランスロケーションし、TRPC チャネルをリン酸化することで、Ca^{2+}の流入を阻害するが、変異型 PKCγでは、TRPC チャネルのリン酸化が正常に行われず、Ca^{2+}流入が継続していることが示唆された。

この結果より、SCA14変異型 PKCγはリン酸化酵素活性能を喪失している可能性が考えられた。そこで、*in vitro* において、変異型 PKCγの酵素活性能を測定した。驚くことに、多くの変異型 PKCγでは無刺激時においても恒常的に活性化していることが判明した。つまり、変異型 PKCγでは酵素活性能を保持したまま、細胞質膜へとトランスロケーションしているにもかかわらず、細胞質膜上の基質をリン酸化することが出来ないという矛盾が生じていた。そこで、野生型と変異型 PKCγの細胞質膜上での動態について詳細な検討を行う必要があると考え、全反射顕微鏡を用いて、細胞質膜直下における野生型、変異型PKCγの動態を1分子レベルで解析した。結果、1分子における変異型 PKCγの細胞質膜滞在時間は野生型に比べて有意に短縮していた。さらに、この膜滞在時間の短縮は C1 ドメインの機能不全によって引き起こされること、つまり、膜上に産生されるジアシルグリセロール（DAG）との結合能の低下が原因であることがわかった。

結果をまとめる。変異型 PKCγ は恒常的に活性化しており、本来の基質以外の蛋白質を無作為にリン酸化している可能性が示唆された。また、刺激に応答し変異型 PKCγ は細胞質膜へとトランスロケーションするが、C1 ドメインの機能不全により DAG と結合できず、TRPC3 チャネルを介した Ca^{2+}流入を制御できなくなっていた。このような異常なリン酸化酵素活性状態や Ca^{2+} 流入は、神経細胞死の引き金の一つとなることが考えられた。今後は、これらの異常がどのように長期的に進行する神経細胞死を引き起こすのかについて解明する必要がある。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第１９５４号	氏　　名	足立　直子
論文題目 Title of Dissertation	脊髄小脳変性症14型を引き起こす変異型PKCγの酵素学的機能解析とCa^{2+}ホメオスタシス異常 Enzymological analysis of mutant protein kinase Cγ causing spinocerebellar ataxia type 14 and dysfunction in Ca^{2+} homeostasis		
審査委員 Examiner	主　査　饗場 篤　印 Chief Examiner 副　査　寺島 俊雄 Vice-examiner 副　査　久田 由美　印 Vice-examiner		
審査終了日	平成２０年　７月　２２日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

脊髄小脳変性症、は小脳や脳幹、脊髄の神経細胞死により運動機能を喪失する難病であり、主な症状として、脊髄・小脳の萎縮に起因する歩行失調、姿勢反射失調、眼振によるめまいなどがある。現在、有効な治療法は無く、発症メカニズムの解明、根本的治療方法の開発が急がれている。近年、第 19 染色体に連鎖する常染色体優性遺伝型の脊髄小脳変性症(SCA)として SCA14 が同定され、プロテインキナーゼ C (PKCγ) の 1 アミノ酸変異が、原因遺伝子であることが同定された。この報告以降、PKCγ 遺伝子上で 22 種の変異が報告されてきたが、興味深いことにこのうち 18 種が PKCγ の機能調節に重要な C1 ドメイン(C1A、C1B)に集中しており、また、それ以外の変異も種を越えて高度に保存された領域に位置していた。しかしながら、これらの変異がどのように神経変性に関与しているのかは全く解っていない。そこで本研究では、SCA 患者より発見された PKCγ の 1 アミノ酸変異が PKCγ の機能をどのように変化させ、SCA 発症に至るのかを解明することを目的とし、培養細胞における分子レベルでの局在や動態、酵素学的な特性について解析した。

SCA14 変異型 PKCγでは多くの変異が C1 ドメインに集中していることから、これらの変異体では刺激に応じた細胞質膜へのトランスロケーションに変化が見られると予測した。そこで、SCA14 変異型 PKCγを蛍光タンパク質により標識し、細胞刺激時のトランスロケーションを観察、野生型との比較を行った。結果、変異型 PKCγは、刺激後長時間にわたって、細胞質膜上に留まり続けた。そこで、EGTA を加え細胞外液中の Ca^{2+}をキレートしたところ、変異型 PKCγは速やかにリトランスロケーションした。つまり、変異型 PKCγ発現細胞では細胞外からの Ca^{2+}流入により、長時間にわたって PKCγの細胞質膜トランスロケーションを引き起こしている可能性が考えられた。次に細胞内 Ca^{2+}の変化を観察した結果、野生型 PKCγ発現細胞では、刺激後、一過性に上昇した細胞内 Ca^{2+} は速やかに減少した。一方、SCA14 変異体発現細胞では、細胞内 Ca^{2+}の半減期が野生型と比較して長くなっていることが解った。さらに、この Ca^{2+} の流入は 2-APB、SKF-96395 といった、細胞質膜貫通型 Ca^{2+}チャネルの一種である TRPC チャネルの阻害薬により抑制されることから、これらの Ca^{2+}流入には TRPC チャネルを介していることが考えられた。そこで、TRPC チャネルの内、小脳に多く発現している TRPC3 に注目し、PKCγによりリン酸化されるかどうか検討を行った。結果、*In vitro* において PKCγは TRPC3 チャネルをリン酸化し、TRPC3 は PKCγの基質となりえる可能性が示唆された。さらに、細胞内において、野生型では刺激依存的に TRPC3 のリン酸化が検出されたが、SCA14 変異体では有意なリン酸化は確認出来なかった。つまり、野生型PKCγは刺激に応じて細胞質膜へとトランスロケーションし、TRPC チャネルをリン酸化することで、Ca^{2+}の流入を阻害するが、変異型 PKCγでは、TRPC チャネルのリン酸化が正常に行われず、Ca^{2+}流入が継続していることが示唆された。

この結果より、SCA14変異型 PKCγはリン酸化酵素活性能を喪失している可能性が考えられた。そこで、*in vitro* において、変異型 PKCγの酵素活性能を測定した。驚いたことに、多くの変異型 PKCγでは無刺激時においても恒常的に活性化していることが判明した。つまり、変

異型 PKCγでは酵素活性能を保持したまま、細胞質膜へとトランスロケーションしているにもかかわらず、細胞質膜上の基質をリン酸化することが出来ないという矛盾が生じていた。そこで、野生型と変異型 PKCγの細胞質膜上での動態について詳細な検討を行う必要があると考え、全反射顕微鏡を用いて、細胞質膜直下における野生型、変異型 PKCγの動態を 1 分子レベルで解析した。結果、1分子における変異型 PKCγの細胞質膜滞在時間は野生型に比べて有意に短縮していた。さらに、この膜滞在時間の短縮は C1 ドメインの機能不全によって引き起こされること、つまり、膜上に産生されるジアシルグリセロール(DAG)との結合能の低下が原因であることがわかった。

本研究は、SCA14 発症において変異型 PKCγがどのような機構で神経変性を導くかを明らかにするために、1分子イメージングをはじめとする細胞生物学的な解析を行った結果、変異型 PKCγ は細胞質膜へとトランスロケーションするが、C1 ドメインの機能不全により DAG と結合できず、TRPC3 チャネルを介した Ca^{2+}流入を制御できないことにより、細胞内 Ca^{2+}濃度調節の異常を引き起こすことを示す有力な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。